

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年3月18日 (18.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/022600 A1(51) 国際特許分類: C07K 19/00,  
14/00, C12N 15/09, C12Q 1/66

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011285

(22) 国際出願日: 2003年9月4日 (04.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-261229 2002年9月6日 (06.09.2002) JP  
特願2002-357407  
2002年12月10日 (10.12.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTI-  
TUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND  
TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区  
霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

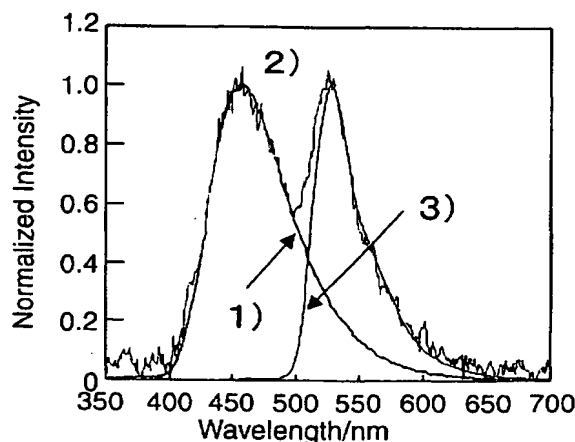
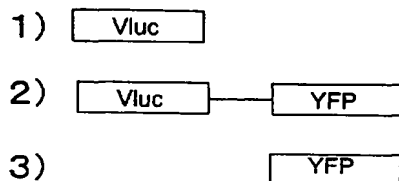
(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 近江谷 克裕  
(OHMIYA, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒563-8577 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術  
総合研究所 関西センター内 Osaka (JP). 芦高 恵美子  
(ASHITAKA, Emiko) [JP/JP]; 〒570-8506 大阪府守口  
市文園町10-15 関西医科大学医化学講座内 Osaka  
(JP). 伊藤 誠二 (ITO, Seiji) [JP/JP]; 〒570-8506 大阪府  
守口市文園町10-15 関西医科大学医化学講座内  
Osaka (JP).(74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Elji et al.); 〒  
541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜  
TNKビル Osaka (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

/続葉有/

(54) Title: SECRETORY OR MEMBRANE-BINDING CHIMERIC PROTEIN

(54) 発明の名称: 分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質



(57) Abstract: A secretory or membrane-binding chimeric protein composed of an energy-generating protein and an energy-receiving protein ligated to each other, in which energy transfer can arise between the energy-generating protein and the energy-receiving protein.

(57) 要約: エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質を連結してなる、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質との間にエネルギー移動が起こり得る分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/022600 A1

WO 2004/022600 A1



OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明細書

## 分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質

## 技術分野

- 5 本発明は、分泌型または膜結合型キメラ蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子、細胞の遺伝子転写活性の測定または評価方法並びに遺伝子発現を調節する薬物のスクリーニング方法に関する。本発明は、蛋白質の修飾を調節する酵素の遺伝子転写発現調節や酵素活性を調節する薬剤のスクリーニング方法も包含する。

本発明のキメラ蛋白質は、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質との  
10 間のエネルギー移動特性を利用することができる。

## 背景技術

- 発光酵素と蛍光蛋白質の間に起こるエネルギー移動の現象は、発光クラゲや発光シイタケの中で起こる自然現象であり、そのメカニズムは分子レベルで解明され(Ohmiya, Y. and Hirano, T.:Shining the light: the mechanism of the bioluminescence reaction of  
15 calcium-binding photoproteins. (1996) *Chemistry & Biology*, 3, 337-347 など)、さらにこの自然現象を模倣した Renilla ルシフェラーゼ及びグリーン蛍光蛋白質融合遺伝子が構築され、ルシフェラーゼ活性及び蛍光活性を用いて遺伝子発現を定量的且つ定性的にモニターする方法が知られている(米国特許第 5976796 号およびWO98/14605)。

- Renilla ルシフェラーゼは Renilla reniformis から精製された酵素である。この酵素は、  
20 酵素の存在下で発光基質セレンテラジンの酸化脱炭酸を触媒して、478nm の極大発光波長を伴う青色光を生成する。しかし自然界では Renilla reniformis 中に存在するグリーン蛍光蛋白質へのエネルギー転移に起因した 510nm の極大波長を有する緑色へとシフトする。Renilla ルシフェラーゼの遺伝子は既にクローン化され、そしてcDNA は遺伝子の転写活性を測定するレポータ遺伝子として有用であることが示されている。

- 25 蛍光蛋白質は発光クラゲ、発光ウミシイタケ等の発光酵素の共在する場合と、サボテンのように単独に存在する場合がある。発光クラゲ Aequorea victoria から精製されたグリーン蛍光蛋白質は発光蛋白質より青色の光を受け、これを緑色の光に変換する。この遺伝子はクローン化され、そのcDNA は細胞内で発現すると補因子を必要とせず青色励起光によって緑色の蛍光を発するので、種々の生物系(細菌、真菌、および哺乳類動物組織

等)で強力なレポータ遺伝子である。野生型グリーン蛍光蛋白質改変体では、明るい発光を伴う赤方シフトの改変体や、哺乳類細胞の安定性を特化したものがある。また、天然サンゴより赤色蛍光蛋白質cDNA がクローン化され、これは同じくレポータ遺伝子として有用である。

- 5 従来発明された Renilla ルシフェラーゼ及びグリーン蛍光蛋白質融合遺伝子構築物の細胞内での局在は Renilla ルシフェラーゼの特性に依存して細胞質内全般に存在し、局在することはない。また、Renilla ルシフェラーゼの発光基質は細胞透過性がなく、細胞を一度、溶解させなければ、細胞内の遺伝子発現を検出できない。

- 発光性甲殻類ウミボタル *Vargula hilgendorffii* やその近縁種 *Cypridina noctiluca* は分泌性の発光酵素を持ち、既にウミボタル発光酵素のcDNA はクローン化されている。ウミボタル発光基質 *Cypridina* ルシフェリンと反応して最大発光波長 460nm の青色の光を発する。クローン化されたcDNA はレポータ遺伝子として、発光酵素が細胞外に分泌されることから細胞を破壊することなく遺伝子転写活性が測定できる。また、この分泌型発光酵素を画像解析することで細胞からの蛋白質の分泌を可視化することができる。一方、青色
- 10 発光するが、エネルギー移動のドナー蛋白質として実用化された例はない。

- 本発明は、分泌型または膜結合型のエネルギー移動特性を有する蛋白質融合物を構築し、細胞外または細胞表面で測定可能なエネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質の2機能をもつ構築物の作成及び利用を目的とする。細胞外で遺伝子転写活性をエネルギー移動特性として測定、併せて細胞内から細胞外への分泌経路等をエネルギー移動特性によって評価できる。また、分泌型または膜結合型キメラ蛋白質のエネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質の間、或いはエネルギー発生蛋白質またはエネルギー受容蛋白質の内部にモニターペプチドを挿入し、モニターペプチドの切断によるエネルギー移動の変化を指標としてペプチド3次元構造情報を得ることができる。特に、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質として、発光酵素と蛍光蛋白質を使用し
- 20 た場合、発光酵素の放つ発光が蛍光蛋白質を励起し、エネルギー移動により発光色が変化することで、励起光を用いずに蛍光測定可能な融合構築物を作成することができる。

図面の簡単な説明

図1aは、PCR法により増幅したウミボタル発光酵素遺伝子(Vluc)と変異型黄色蛍光蛋白質遺伝子(EYFP)を哺乳類細胞発現用ベクターpEF-BOSに挿入した発光蛍光融合蛋白質ベクターの構築。

図1bは、哺乳類細胞発現用ベクターpEF-BOSに挿入したウミボタル発光酵素遺伝子(Vluc)と変異型黄色蛍光蛋白質遺伝子(EYFP)の発光蛍光融合蛋白質。

図2は、分泌型発光・蛍光融合蛋白質(Vluc-EYFP)を導入した細胞内及び細胞外でのウェスタンブロット解析。

図3は、分泌型(Vluc-EYFP)、非分泌型(Rluc-EYFP)の発光蛍光融合蛋白質分子プローブを導入したCos7細胞の蛍光画像。

10 図4は、単独ウミボタル発光酵素(Vluc)と発光蛍光融合蛋白質(Vluc-EYFP)の発光活性の比較。

図5は、発光酵素単独及び発光酵素-蛍光蛋白質融合体の発光スペクトル。エネルギー移動したピークは蛍光蛋白質の蛍光スペクトルと一致した。1) Vluc単独の発光、2) Vluc-EYFPの発光、3) EYFPの発光

15 図6は、発光酵素-蛍光蛋白質融合体に異なるモニターペプチドを挿入したときのエネルギー移動効率の変化(発光スペクトルの変化)を示す。

図7は、挿入ペプチド1, 2の予想される2次構造及び疎水性を示す。

図8は、本発明のシステムの模式図を示す。エネルギー発生タンパク質には分泌型、膜結合型が存在する。本発明のキメラ蛋白質では、エネルギー発生蛋白質からエネルギー受容蛋白質にエネルギーが移動し(黒矢印)、エネルギー受容蛋白質からの光等のエネルギー(白矢印)を検出することが可能になる。一方、モニターペプチドへの外部因子の結合やモニターペプチドの切断によりキメラ蛋白質の立体構造が変化すると、エネルギー発生蛋白質からのエネルギーがエネルギー受容蛋白質に届かなくなる。

25 図9は、分泌型キメラ蛋白質のシステム例を示す。図9では、分泌型蛋白質はエネルギー発生蛋白質である。

図10は、膜結合型キメラ蛋白質のシステム例を示す。図10では、膜結合領域は、エネルギー発生蛋白質内に存在する。膜結合領域は、モニターペプチドにあってもよく、エネルギー受容蛋白質にあってもよい。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質を融合化した遺伝子を構築し、本発明を完成するに至った。

本遺伝子では既に遺伝子データベース上に記載されるタンパクを融合化することで得られたが、この組合せは未知であり、後述するように、融合構築物を発現解析し、分泌ないし膜結合特性、エネルギー発生(例えば発光)特性、及びエネルギー受容(例えば蛍光)特性の3つの特性が備わっていることは本発明者が初めて明らかにした。また、本来生物界に存在しない分泌型発光酵素(ウミボタルルシフェラーゼ)と蛍光蛋白質(YFP)の組合せでも、エネルギー移動が起きることを明らかにしたのは、本発明者が初めてである。

- 10 項1. エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質を連結してなる、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質との間にエネルギー移動が起こり得る分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質。

項2. 以下の(1)～(6)のいずれかの構造を有する項1に記載の分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質:

- 15 (1)(分泌型エネルギー発生蛋白質)－(エネルギー受容蛋白質);  
(2)(分泌型エネルギー受容蛋白質)－(エネルギー発生蛋白質);  
(3)(膜結合型エネルギー発生蛋白質)－(エネルギー受容蛋白質);  
(4)(膜結合型エネルギー受容蛋白質)－(エネルギー発生蛋白質);  
(5)(シグナルペプチド)－(エネルギー発生蛋白質)－(エネルギー受容蛋白質);  
20 (6)(シグナルペプチド)－(エネルギー受容蛋白質)－(エネルギー発生蛋白質)。

項3. モニターペプチドを、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質の間、エネルギー発生蛋白質の内部あるいはエネルギー受容蛋白質の内部に、エネルギー発生特性ないしエネルギー受容特性を維持できるように導入し、かつ、モニターペプチドの切断によりエネルギー移動が抑制される項1に記載のキメラ蛋白質。

- 25 項4. エネルギー発生蛋白質が発光蛋白質である項1～3のいずれかに記載のキメラ蛋白質。

項5. 発光蛋白質がルシフェラーゼである項4に記載のキメラ蛋白質。

項6. エネルギー受容蛋白質が蛍光蛋白質又は着色蛋白質である項1～3のいずれかに記載のキメラ蛋白質。

- 項7. 蛍光蛋白質がGFP, YFP, BFP, CFP、DsRED またはRFPである項6に記載のキメラ蛋白質。
- 項8. 配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する、項1に記載のキメラ蛋白質。
- 項9. 項1～8のいずれかに記載の分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。
- 5 項10. 項9に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- 項11. 項10に記載のベクターによって形質転換された形質転換体。
- 項12. 項11に記載の形質転換体を培養液中で培養する工程；該培養液から分泌型または膜結合型キメラ蛋白質を回収する工程を包含する分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質の製造方法。
- 10 項13. 宿主細胞中の遺伝子転写活性の測定(評価)方法であって、項11に記載の形質転換体を培養し、培養液中に分泌されるか、あるいは細胞膜に結合される分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質のエネルギー移動を定量することを特徴とする方法。
- 項14. 細胞内における遺伝子発現を調節する薬物のスクリーニング方法であって、培養液中に薬物候補化合物を存在させて項11に記載の形質転換体を培養する工程、該候補化合物の存在下及び非存在下での培養液中に分泌されるか、あるいは、細胞膜に結合する分泌型または膜結合型キメラ蛋白質のエネルギー移動を定量的に比較する工程を包含する方法。
- 15 項15. 細胞内における遺伝子発現を調節する薬物が、蛋白質の修飾を調節する酵素の遺伝子転写発現調節ないし酵素活性を調節する薬物である項14に記載の方法。
- 20 項16. 形質転換体が、配列番号1に示されるポリヌクレオチド配列を含む、項14に記載の方法。

以下、本発明を説明する。

- 25 本発明のキメラ蛋白質は、分子内のエネルギー移動が可能である特徴を有する。分子内のエネルギー移動とは、エネルギー発生蛋白質（例えば生物発光蛋白質）から放出されるエネルギー（例えば光エネルギーなど）とエネルギー受容蛋白質（蛍光蛋白質、着色蛋白質）との間にエネルギー移動が起こることを意味し、エ

エネルギー移動の結果、例えば蛍光蛋白質では外部から光を与えなくても蛍光を発する点に特徴を有し、これによりエネルギー移動の程度を定量することができる。

エネルギー発生蛋白質としては、生物発光蛋白質(ルシフェラーゼなどの発光酵素)が好ましく例示される。

- 5 エネルギー受容蛋白質としては、蛍光蛋白質、着色蛋白質などが例示できる。エネルギー受容蛋白質は、エネルギーの受容を確認可能な蛋白質であり、例えば蛍光蛋白質では、蛍光を測定することにより、エネルギー移動の程度を定量することができる。

以下、エネルギー発生蛋白質として分泌型生物発光蛋白質、エネルギー受容蛋白質として蛍光蛋白質を用いた場合を例に取り、さらに具体的に説明する。

- 10 該キメラ蛋白質は分泌性であり、細胞外にルシフェリンを与えることによりその存在を蛍光により容易に検出可能である。なお、キメラ蛋白質が膜結合性の蛋白質であっても、ルシフェリンを与えることにより同様に検出可能である。

GFPのような蛍光蛋白質のみでは、蛍光による定性分析は可能であるが、外部からの励起光により蛍光を発するため定量することはできない。一方、本発明のキメラ蛋白質で

- 15 は生物発光蛋白質からの励起光により蛍光蛋白質から蛍光を発するので、キメラ蛋白質の各修飾体(モニターペプチドにおける切断、糖鎖による修飾等)をその蛍光波長のシフトに基づき各々定量することが可能である。

本発明において、モニター蛋白質は、生物発光蛋白質から蛍光蛋白質への光エネルギーの移動を妨げないものであれば特に限定されない。モニターペプチドの

- 20 アミノ酸の数は、通常5～100個、好ましくは6～50個、より好ましくは6～20個、特に6～15個である。モニターペプチドは、その切断によりエネルギー移動が起こらなくなる位置に導入されるのが好ましい。モニターペプチドの導入位置としては、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質の間、エネルギー発生蛋白質の内部、エネルギー受容蛋白質の内部が例示され、エネルギー発
- 25 生蛋白質とエネルギー受容蛋白質の間に導入するのがより好ましい。モニターペプチドがエネルギー発生蛋白質の内部に導入された場合、その導入後もエネルギー発生特性は残存し、かつ、モニターペプチドが切断されることによりその発光特性が喪失する。同様に、モニターペプチドがエネルギー受容蛋白質の内部に導入された場合、その導入後もエネルギー受容特性は残存し、かつ、モニターペプ



チドが切断されることによりそのエネルギー受容特性（例えば蛍光特性）が喪失する。

該モニターペプチドに制限酵素部位を導入すれば、キメラ蛋白質の製造がより容易になる。該モニターペプチドに特定のプロテアーゼに対する蛋白質加水分解部位を導入すると、分泌過程における蛋白質加水分解酵素の働きを定量することができ、各種分泌蛋白質のプロセッシング酵素の機能に影響する物質を定量的にスクリーニングすることが可能になる。好ましいモニターペプチド配列の1つは、配列番号4に示される40個のアミノ酸からなる配列（スペーサーペプチド配列1）である。

- 10  他のモニターペプチドとしては、プロセッシング酵素 PC1 により R の C 末端側が切断され得る天然蛋白質の部分配列である S E Q K Q L Q K R F G G F T G G（配列番号10）で表される配列が例示される。このモニターペプチド配列を有するキメラ蛋白質は、エネルギー移動特性を有し、プロセッシング酵素 PC1 により該配列の R の C 末端側が切断されることによりエネルギー移動特性を失うことを
- 15  本発明者は確認している。

一方、非天然のポリペプチドであるスペーサーペプチド配列2を有するキメラ蛋白質は、エネルギー移動を生じない。

- このように、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質の間のエネルギー移動を可能にするために、モニターペプチドは天然のポリペプチドの部分アミノ
- 20  酸配列であるか、或いは天然のポリペプチドのアミノ酸配列に類似する配列であるのが好ましい。天然のポリペプチドまたはその部分配列をモニターペプチドとすることで、当該天然配列の特性（例えばプロセッシング酵素（PC1、PC2、フリン、プロテアソーム、カプテシン、トロンビンなど）を含む種々のプロテアーゼによる切断特性、酵素の基質、受容体のアゴニスト／アンタゴニスト、あるいは
- 25  蛋白質、糖類、低分子物質などの結合因子の結合特性など）をエネルギー移動の変化に基づき測定または評価することができる。

本明細書において、生物発光蛋白質としては、ウミボタル、ヒオドシエビ、発光昆虫（ホタル、ヒカリコメツキなど）、発光ミミズ、ラチア、ウミシイタケ、オワンクラゲ（エクオリン）などの各種発光生物由来のルシフェラーゼが例示される。例えば、ウミボタル・ルシフェラー

ゼは分泌型であるのでそのまま分泌型生物発光蛋白質として利用でき、ウミシイタケ由来のルシフェラーゼのように非分泌型ルシフェラーゼの場合には、N末端側にシグナルペプチドを導入し、分泌型生物発光蛋白質として利用することもできる。

蛍光蛋白質としては、グリーン蛍光蛋白質(GFP)、黄色蛍光蛋白質(YFP)、青色蛍光蛋白質(BFP)、シアン蛍光蛋白質(CFP)、DsRED、赤色蛍光蛋白質(RFP)などが例示される。

着色蛋白質としては、フィコシアニン、フィコエリトリンが挙げられる。

本発明の蛍光蛋白質または着色蛋白質は、生物発光蛋白質から放出される光が蛍光蛋白質の励起波長または着色蛋白質の吸収波長になるように選択される。このような組み合わせとしては、例えば以下のものが挙げられる。

表1

生物発光蛋白質	蛍光蛋白質または着色蛋白質
ウミボタル・ルシフェラーゼ	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP、
ホタル・ルシフェラーゼ	DsRED、フィコシアニン、フィコエリトリン
発光性渦鞭毛藻・ルシフェラーゼ	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP
ヒカリコメツキ・ルシフェラーゼ	DsRED
ウミシイタケ・ルシフェラーゼ	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP
エクオリン	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP、

分泌型生物発光蛋白質と蛍光蛋白質は、直接連結させてもよく、両者の間にモニターペプチド配列を介在させて連結してもよい。

15 本発明のキメラタンパクには、以下の 1)－3)に示す蛋白質が包含される。

1) 分泌型生物発光蛋白質の C 末端側に蛍光蛋白質を連結した分泌型キメラ蛋白質。  
該蛋白質の好ましい実施形態の1つが、配列番号1記載のアミノ酸配列によって表わされる蛋白質である。

2) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換  
20 若しくは付加されたアミノ酸配列より表わされ、且つ分泌性、発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有する融合構築物。

3) 上記1)の蛋白質に分泌性、発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を失わない程度の変異が導入された蛋白質。このような変異は、自然界において生じる(例えば対立遺伝子)ほかに、人為的な変異も含む。人為的な変異を生じさせ

る手段としては、部位特異的変異誘導法 (Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500, 1982) などを挙げるができるが、これに限定されるわけではない。変異したアミノ酸の数は、分泌、発光、蛍光活性及びエネルギー移動特性が失われない限り、その個数は制限されないが、好ましくは発光酵素及び蛍光蛋白質部分において 20 アミノ酸以内であり、より好ましくは 15 アミノ酸以内であり、更に好ましくは 10 アミノ酸以内であり、最も好ましくは 5 アミノ酸以内である。また、発光酵素及び蛍光蛋白質を連結するモニターペプチドは、1~100個のアミノ酸について、任意に置換、欠失、付加、挿入することができる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入により変異を導入する場合には、変異を導入したタンパクが発光・蛍光活性を維持しているかは、そのタンパクの発光・蛍光活性を調べることによって判定できる。

本発明のポリヌクレオチドには、分泌型生物発光蛋白質の C 末端側または N 末端側に蛍光蛋白質を連結した分泌型または膜結合型キメラ蛋白質をコードするポリヌクレオチドが包含される。該ポリヌクレオチドの好ましい実施形態の 1 つとして、配列番号 1 または 2 記載の塩基配列により表わされる DNA 又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA が挙げられ、該 DNA がコードするタンパクは、分泌活性、発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有する融合構築物である。

上記の DNA がコードするタンパクは、DNA 同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる分泌型発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有する蛋白質である。本明細書において「ストリンジェントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、「1xSSC, 0.1%SDS, 37℃」程度であり、好ましくは「0.5xSSC, 0.1%SDS, 42℃」程度であり、更に好ましくは「0.2xSSC, 0.1%SDS, 65℃」程度である。配列番号 1 または 2 記載のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって得られる DNA は配列番号 1 または 2 記載の塩基配列により表わされる DNA と通常高い相同性を有する。高い相同性とは、60%以上の相同性、好ましくは 75%以上の相同性、更に好ましくは 90%以上の相同性、特に 95%以上の相同性を指す。

本発明のタンパクは、後述する本発明の遺伝子を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞内で発現させることにより得ることができる。発現ベクターとして、例えば、pBT-VL-mp-YFP (VL はウミボタル・ルシフェラーゼ、mp はモニターペプチド、YFP は黄色蛍

光蛋白質をそれぞれ示す)などを用いることができ、宿主細胞としては哺乳動物細胞、酵母などの真核生物細胞、大腸菌、枯草菌、藻類、真菌類などの原核生物細胞が挙げられ、そのいずれを用いてもよい。好ましい宿主細胞としては、哺乳動物培養細胞 COS7 細胞株(この系では哺乳類系のタンパク合成、タンパク修飾過程を経ることが重要であり、  
5 つまり、この過程をモニタリングする)などを用いることができる。

本発明の好ましいキメラ蛋白質をコードする遺伝子(ポリヌクレオチド)は、

- 1) 配列番号1記載の塩基配列を有する遺伝子;および
- 2) 配列番号1記載の塩基配列により表わされる DNA 又はそれと相補的な DNA とストリ  
ンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を有する遺伝子

10 である。

図8～10に本発明のシステムの模式図を示す。図8に示すように、本発明のキメラ蛋白質は、モニターペプチドの構造変化がない場合、黒矢印に示すようにエネルギー発生蛋白質からエネルギー受容蛋白質にエネルギーが移動し、エネルギー受容蛋白質からの光等のエネルギー(白矢印)を検出することが可能になる。

15 一方、モニターペプチドへの外部因子の結合やモニターペプチドの切断によりキメラ蛋白質の立体構造が変化すると、エネルギー発生蛋白質からのエネルギーがエネルギー受容蛋白質に届かなくなる。キメラ蛋白質から発せられるエネルギーは、エネルギー受容蛋白質を介するもの(図8の白矢印)とエネルギー発生蛋白質から直接発せられるもの(図8の黒矢印)とで異なるので、キメラ蛋白質から  
20 のエネルギーを測定することにより、キメラ蛋白質に影響する因子の影響の程度を定量することが可能である。例えば、該因子が薬物の候補化合物である場合、以下に示すように、本発明のキメラ蛋白質は薬物のスクリーニング系に有用である。

図9に示すように、本発明のキメラ蛋白質のエネルギー発生蛋白質が分泌型蛋白質で  
25 ある場合、プロセッシング酵素活性などの分泌経路上の変化をモニターするのに有用である。また、図10に示すように、本発明のキメラ蛋白質が膜結合型蛋白質である場合、膜周辺の細胞内変化ないし細胞外変化をモニターするのに有用である。

(スクリーニング方法)

本発明のキメラ蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ形質転換体を培養することにより、宿主細胞中の遺伝子転写活性を定量的に測定（評価）することができ、また、細胞内における遺伝子発現を調節する薬物をスクリーニングすることができる。

- 5 本発明のキメラ蛋白質は、細胞内に導入し、蛍光強度及び波長のシフトを追跡することによって、細胞内において、mRNAからのタンパク合成の速度、合成された蛋白質のフォールディングやプロセッシング、蛋白質の膜結合ないし分泌の機構などが正常に働いているかどうかを検証することができる。

- 従って、本発明のキメラ蛋白質を発現可能な形質転換体を、薬物の候補化合物の存在下に培養した場合と、非存在下に培養した場合の結果を比較することにより、当該候補化合物がタンパク発現系にどのような作用を及ぼすかが分かり、タンパク発現系（遺伝子発現系）に作用する候補化合物を選択することが可能である。

- 比較対象としては、融合蛋白質の発現の総量、細胞内と細胞外における融合蛋白質の発現量の比較、融合蛋白質の蛍光蛋白質に対応する蛍光波長のシフトの程度、モニターペプチドの切断・糖鎖結合の程度などが挙げられる。
- 15

例えば、糖尿病患者の中には、プロインシュリンからインシュリンへのプロセッシングの異常、つまり切断部位のアミノ酸残基の変異や蛋白質限定分解酵素の活性低下に伴い活性型のインシュリンを合成出来ない場合がある。このようなプロセッシングの異常を正常にする薬物は、糖尿病治療薬として有用である。

- 20 また、プロオピオメラノコルチコトロピン(POMC)は、共通の前駆物質とするペプチドホルモンとして、ACTH、 $\beta$ リポトロピン( $\beta$  LPH)、 $\alpha$  および  $\beta$  メラニン細胞刺激ホルモン(MSH)、エンケファリンとエンドルフィンがあり、POMC から活性ペプチドへの切断過程に影響を与えることで、ACTH の切り出しを指標とした抗炎症剤やエンドルフィンの切り出しを指標とした鎮痛剤のスクリーニング系としても使用可能である。

- 25 本発明の分泌型キメラ蛋白質は細胞外に分泌されるため、培養液中に発光基質（ルシフェリン）を加えて生物発光蛋白質と蛍光蛋白質を各々独立して定量することができる。蛍光蛋白質の切断、モニターペプチドの切断や糖鎖修飾などにより生物発光蛋白質と蛍光蛋白質の発光の程度は大きく影響されるため、本発明の

スクリーニング系により、薬物候補化合物がどの程度遺伝子発現系に影響を与えたのかを定量的に評価できる。

- 本発明のキメラ蛋白質は細胞外に分泌されるため、細胞を破壊することなく、培養液中に発光基質(ルシフェリン)を加えることで発光スペクトルや発光活性を測定することができ、生物発光蛋白質と蛍光蛋白質の間に起きているエネルギー移動を定量化できる。分泌された融合蛋白質は細胞内で生理的な分泌過程を経て、多くの修飾を受けている。モニターペプチドの切断や糖鎖修飾などにより生物発光蛋白質と蛍光蛋白質の間に起きるエネルギー移動は顕著に変化、発光スペクトルの形状が変化する。本発明のスクリーニング系により、例えばモニターペプチドの切断に伴って、エネルギー移動は消失、或いは糖鎖修飾によりエネルギー移動が増減するため、薬物候補化合物がどの程度、切断や糖鎖修飾を行う蛋白質修飾酵素の酵素活性やその遺伝子発現に影響を与えたのか、を定量的に評価できる。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 以下、本発明を、実施例を挙げてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されることはない。

##### 実施例1

- ウミボタル発光酵素(Vargula Luciferase;;以下、「VL」または「Vluc」と略すことがある)遺伝子(Thompson, E. M., Nagata, S. & Tsuji, F. I. Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod Vargula hilgendorffii. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6567-71 (1989))及び発光クラゲ由来変異型黄色蛍光蛋白質(EYFP)遺伝子のフラグメントをポリメラーゼ連鎖反応(以下 PCR 法)によって増幅し、哺乳類細胞発現用ベクターに挿入し、発光・蛍光融合蛋白質遺伝子を構築した。図1は、ベクターのマップと、遺伝子部分の配列を記したものである。Vluc を PCR 増幅する際、プライマー1 (5'-(*Hind*III-*Bst*XI):
- 25 CACAAGCTTCCATTGTGCTGGATGAAGATAATAATTCTGTCTGTTATATTGGC-3'; プライマー2 (5'-(*Bam*HI): TGTGGATCCTTGACATTCAGGTGGTACTTCTAG-3')を用い、Vluc の N 末端に開始コドンを与え、C 末端には終止コドンを削除し、*Bam*HI サイトを含むリンカー配列を導入した。一方、EYFP の PCR 増幅はプライマー3 (5'-(*Hind*III-*Not*I-*Bam*HI):

CAAGCTTGCGGCCGCGCAGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTAC-3'), プライマー4 (5'-(*Bst*XI) TACCATTGTGCTGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3')を用い、EYFP の N 末端の開始コドン进行削除し、*Bam*HI サイトを含むリンカー配列を N 末端に連結し、C 末端には終止コドンを導入した。哺乳類細胞発現用ベクターとして既に公知である pE-BOS (S Mizushima & S Nagata pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. Nucleic Acids Research, Vol.18, No.17 P.5322) の *Bst*XI に前記 PCR 増幅産物を順次挿入して発現ベクターを作成し、pEF-BOS Vluc-EYFP と命名した。また、本ベクターでは上流にウミボタル発光酵素遺伝子を下流に発光クラゲ由来変異型黄色蛍光蛋白質遺伝子を配しており、その中間の *Bam*HI 制限酵素部位にはペプチド配列が挿入可能である。

#### 実施例2

発光・蛍光融合蛋白質遺伝子 pEF-BOS Vluc-EYFP を Cos7 細胞に導入したところ、発光・蛍光融合蛋白質 Vluc-EYFP が作られたことを発光酵素 Vluc 抗体、蛍光蛋白質 EYFP 抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した。図2は Vluc、EYFP、Vluc-EYFP をそれぞれ導入した際の細胞内、細胞外培地での結果である。細胞外には Vluc (分子量 63kDa)、EYFP (分子量 27kDa) 及び Vluc-EYFP (分子量 95kDa) が分泌された。Vluc-EYFP の細胞内の発現では、より小さいサイズの蛋白質も作られていたが、分泌したものは完全長のものと考えられる。融合蛋白質が分泌されることから、Cos7 細胞の蛍光画像を観察した。比較として分泌シグナルを持たないウミシイタケ Rluc と EYFP を融合したもの Rluc-EYFP 導入細胞も観察した。図3の蛍光画像によると、Rluc-EYFP の蛍光画像が細胞全体に満遍なく広がるのに対して、Vluc-EYFP では蛍光は細胞内に局所、Vluc-EYFP 蛋白質は Vluc の持つ分泌シグナルに呼応して、局在、分泌されることが確認できた。分泌された Vluc-EYFP の発光活性を測定した結果、図4のように Vluc 単独と比較して、約80%程度の発光活性が保持されていた。以上の結果から、Vluc-EYFP は Vluc の持つ発光活性及び分泌能と、蛍光蛋白質の蛍光能を有する融合蛋白質であることが確認された。また、発光活性はプロモータ活性の強さ、分泌能は分泌過程・経路の可視化能を、蛍光は、融合蛋白質の局在を指している。

#### 実施例3

Vluc-EYFP の発光スペクトルを測定した。図5で示すように2つの発光スペクトルのピーク (図5-2)) が観察され、うち一つは発光酵素単独のもの (図5-1))、つまり最大発光波長 460nm と一致した。また長波長側のピークは蛍光蛋白質単独の蛍光スペクトルのピーク (図5-3)) と一致した。また、発光・蛍光融合蛋白質遺伝子の蛍光スペクトルとも一致した。この長波長側のピークは発光・蛍光蛋白質間のエネルギー移動による、つまり発光蛋白質の発する光が励起光となり蛍光蛋白質より長波長の光、蛍光を発したものである。このエネルギー移動は単独に Vluc と EYFP を加えてもおきないことは確認した。よって、Vluc-EYFP は分泌する特性を持ち、且つ発光、蛍光特性及び発光・蛍光蛋白質間のエネルギー移動特性が保持された構築物である。

#### 10 実施例4

発光・蛍光融合蛋白質遺伝子のリンカー配列部分 BamHI 制限酵素部位に2つのペプチド配列を挿入した。図6では挿入ペプチド1及び挿入ペプチド2に対する発光スペクトルを表わしたものである。挿入ペプチド1ではエネルギー移動が起き、長波長側に小さなピークがみられた。しかしながら、ペプチド配列2ではエネルギー移動が起きなかった。この結果よりエネルギー移動は挿入されたペプチド配列に依存することが明らかとなった。それぞれのペプチド配列の2次構造予測及び疎水性解析を行うとそれぞれのペプチド配列の立体的な構造が異なることが予想され (図7)、このエネルギー移動の違いを指標に挿入ペプチドの立体構造情報を得ることができることが明らかとなった。

本発明は、モニター蛋白質及びそれをコードする遺伝子、本酵素の発現を制御する遺伝子を提供する。この融合蛋白質はウミボタル発光酵素の分泌する特性及び生物発光活性を有し、同時に蛍光蛋白質の蛍光特性を有している。ウミボタル発光酵素-蛍光融合蛋白質は酵素活性に遺伝子の発現量及び細胞からの分泌を、また蛍光から細胞内での分泌部位の位置情報を定量的にモニターするためのマルチマーカーとして利用できる。さらに発光酵素と蛍光蛋白質の間にペプチドを配することでエネルギー移動効率が変化する特性から挿入ペプチドの3次元構造や切断や糖付加等の機能変化情報を得るセンサーとして利用できる。



## 請求の範囲

1. エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質を連結してなる、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質との間にエネルギー移動が起こり得る分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質。
- 5 2. 以下の(1)～(6)のいずれかの構造を有する請求項1に記載の分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質:
  - (1)(分泌型エネルギー発生蛋白質)－(エネルギー受容蛋白質);
  - (2)(分泌型エネルギー受容蛋白質)－(エネルギー発生蛋白質);
  - (3)(膜結合型エネルギー発生蛋白質)－(エネルギー受容蛋白質);
  - 10 (4)(膜結合型エネルギー受容蛋白質)－(エネルギー発生蛋白質);
  - (5)(シグナルペプチド)－(エネルギー発生蛋白質)－(エネルギー受容蛋白質);
  - (6)(シグナルペプチド)－(エネルギー受容蛋白質)－(エネルギー発生蛋白質)。
3. モニターペプチドを、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質の間、エネルギー発生蛋白質の内部あるいはエネルギー受容蛋白質の内部に、エネルギー発生特  
15 性ないしエネルギー受容特性を維持できるように導入し、かつ、モニターペプチドの切断によりエネルギー移動が抑制される請求項1に記載のキメラ蛋白質。
4. エネルギー発生蛋白質が発光蛋白質である請求項1～3のいずれかに記載のキメラ蛋白質。
5. 発光蛋白質がルシフェラーゼである請求項4に記載のキメラ蛋白質。
- 20 6. エネルギー受容蛋白質が蛍光蛋白質又は着色蛋白質である請求項1～3のいずれかに記載のキメラ蛋白質。
7. 蛍光蛋白質がGFP, YFP, BFP, CFP、DsRED またはRFPである請求項6に記載のキメラ蛋白質。
8. 配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のキメラ蛋白質。
- 25 9. 請求項1～8のいずれかに記載の分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。
10. 請求項9に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
11. 請求項10に記載のベクターによって形質転換された形質転換体。

12. 請求項11に記載の形質転換体を培養液中で培養する工程;該培養液から分泌型または膜結合型キメラ蛋白質を回収する工程を包含する分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質の製造方法。

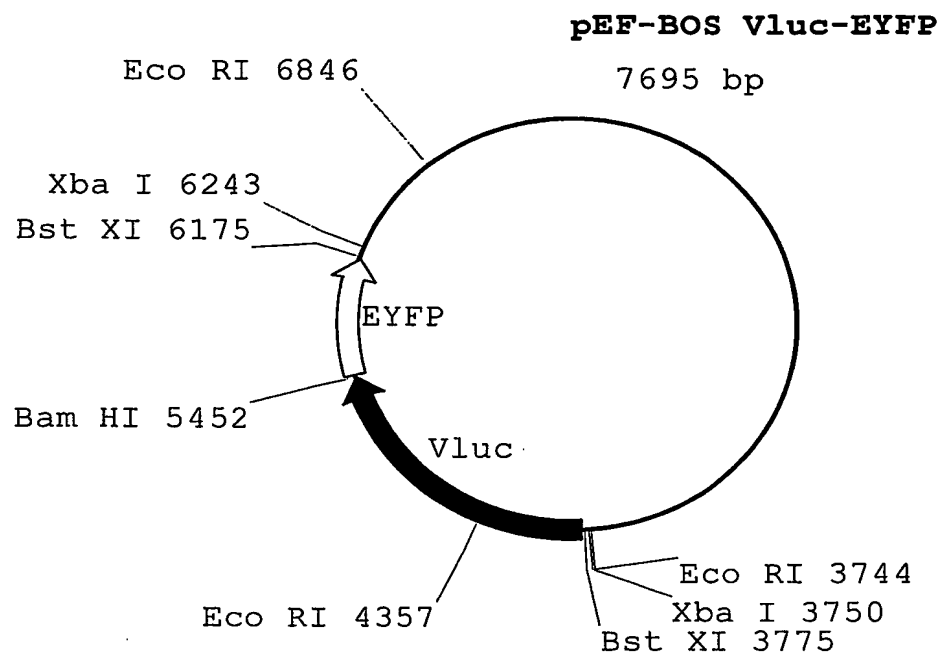
13. 宿主細胞中の遺伝子転写活性の測定方法であって、請求項11に記載の形質転換体を培養し、培養液中に分泌されるか、あるいは細胞膜に結合される分泌型又は膜結合型キメラ蛋白質のエネルギー移動を定量することを特徴とする方法。

14. 細胞内における遺伝子発現を調節する薬物のスクリーニング方法であって、培養液中に薬物候補化合物を存在させて請求項11に記載の形質転換体を培養する工程、該候補化合物の存在下及び非存在下での培養液中に分泌されるか、あるいは、細胞膜に結合する分泌型または膜結合型キメラ蛋白質のエネルギー移動を定量的に比較する工程を包含する方法。

15. 細胞内における遺伝子発現を調節する薬物が、蛋白質の修飾を調節する酵素の遺伝子転写発現調節ないし酵素活性を調節する薬物である請求項14に記載の方法。

16. 形質転換体が、配列番号1に示されるポリヌクレオチド配列を含む、請求項14に記載の方法。

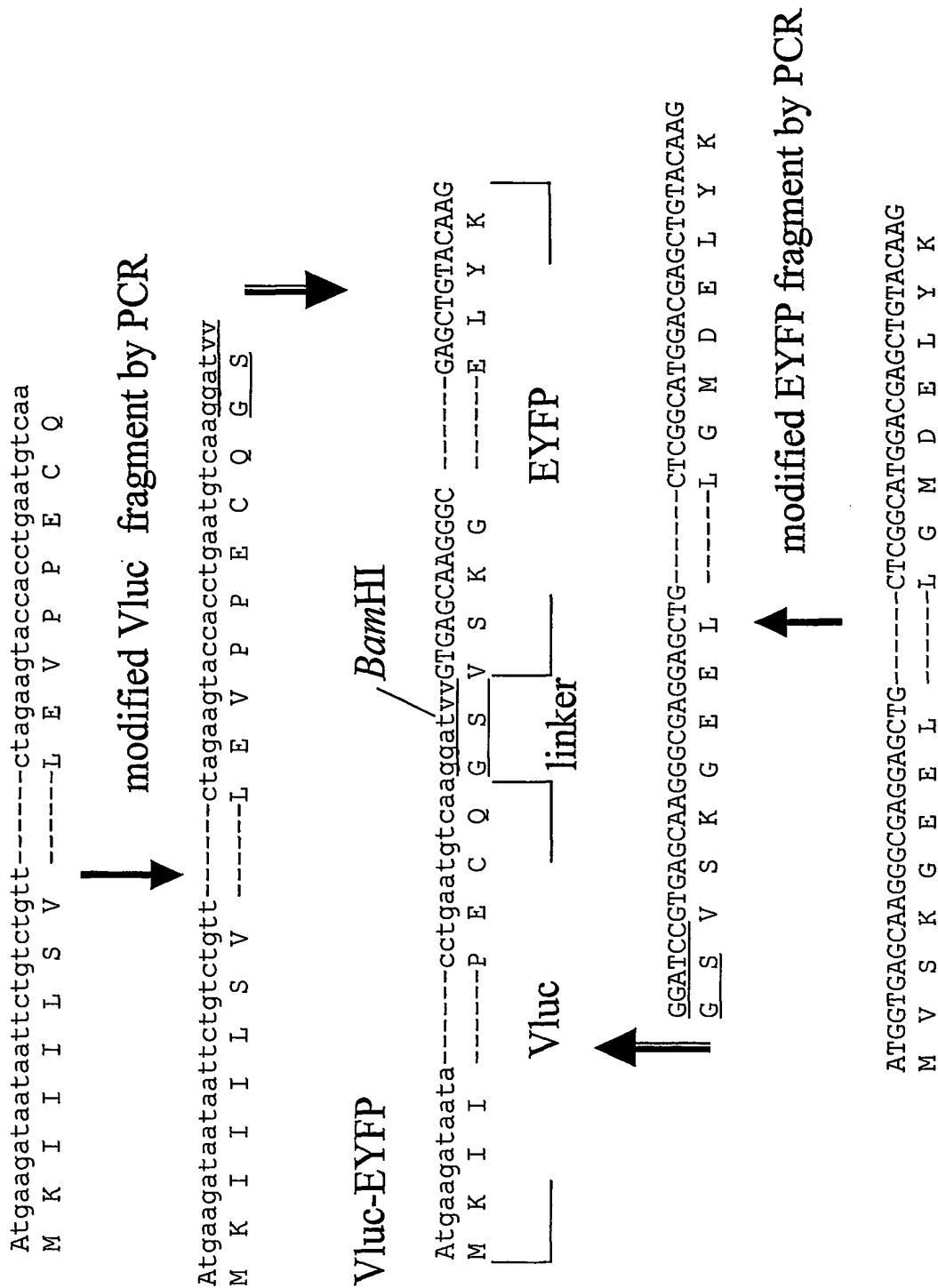
1 / 11  
Fig. 1a



**Plasmid name:**pEF-BOS Vluc-EYFP

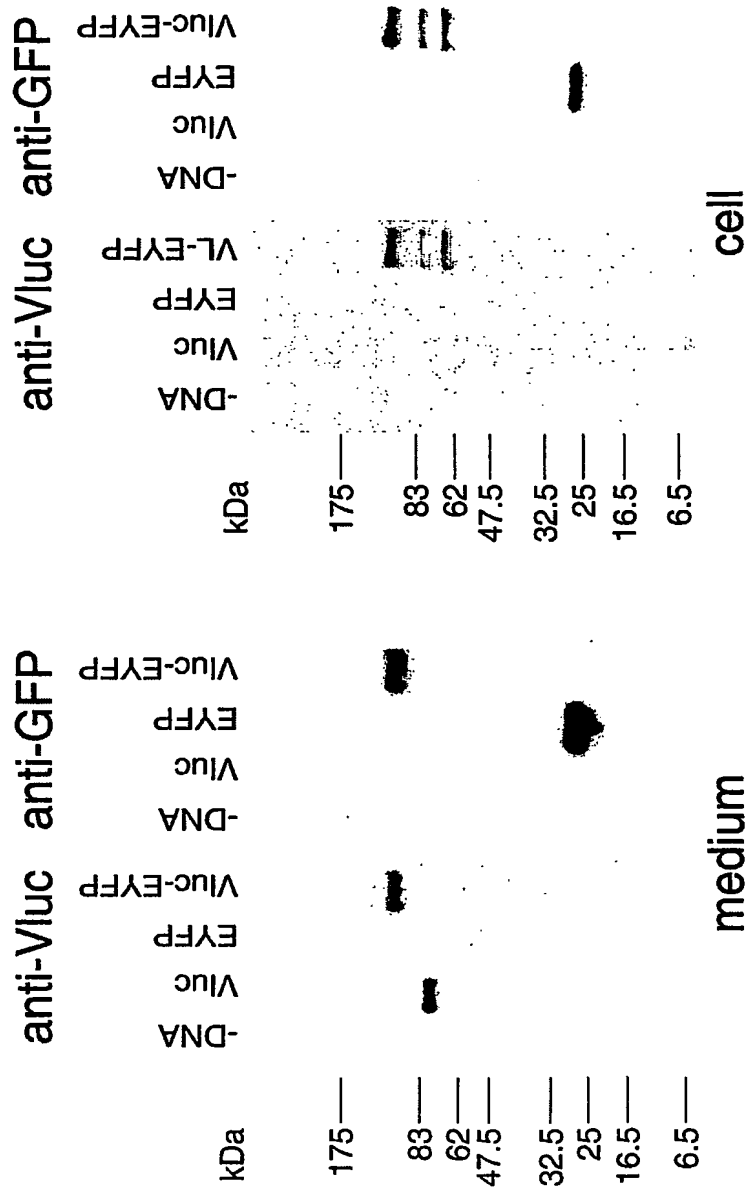
**Plasmid size:**7695 bp

2 / 11  
Fig. 1b



3 / 11

Fig. 2



4/11  
Fig. 3

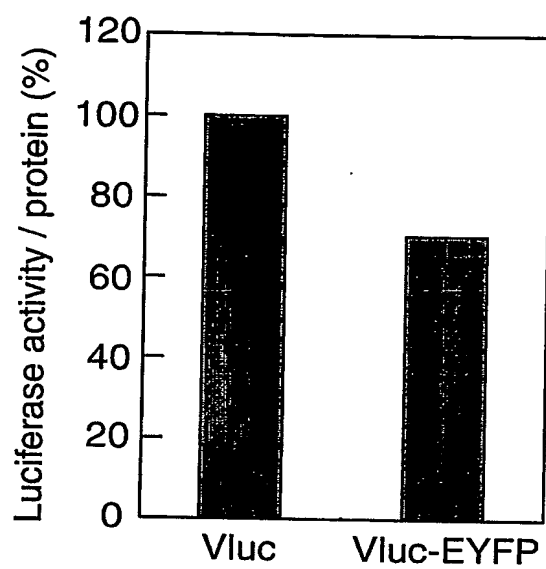
Rluc-EYFP



Vluc-EYFP

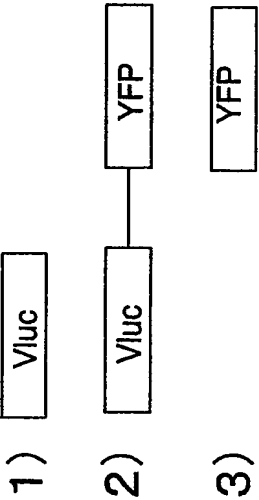
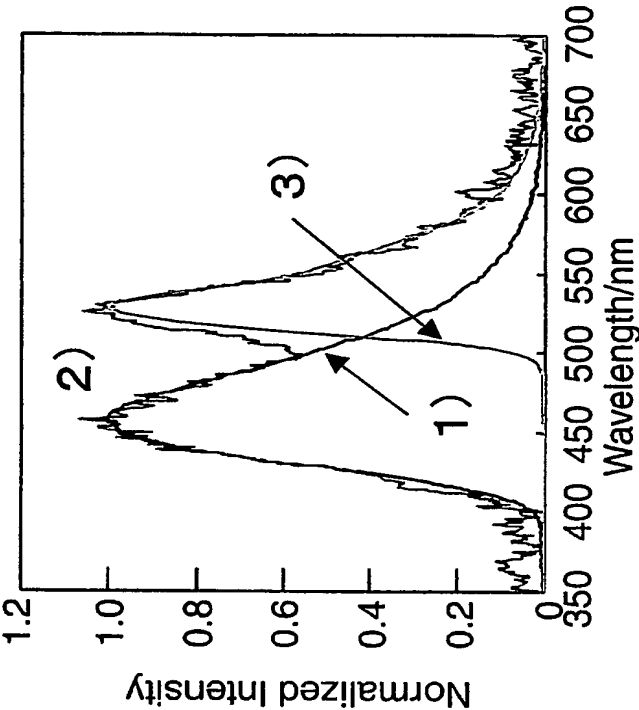


5 / 11  
Fig. 4

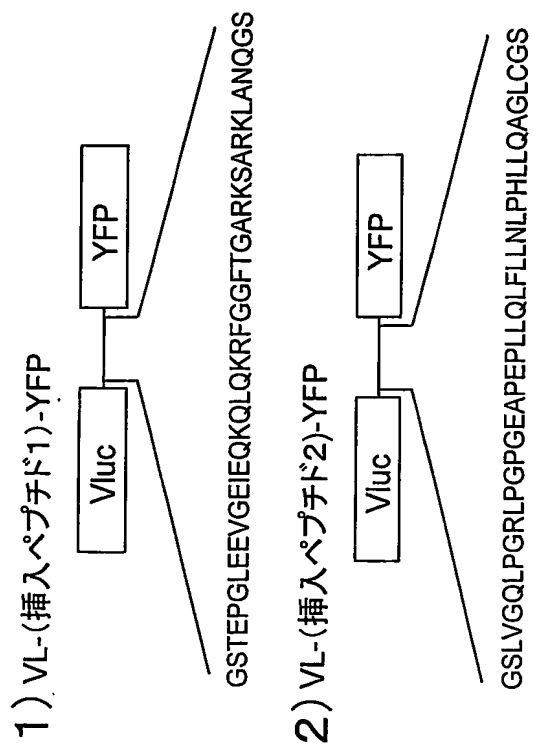
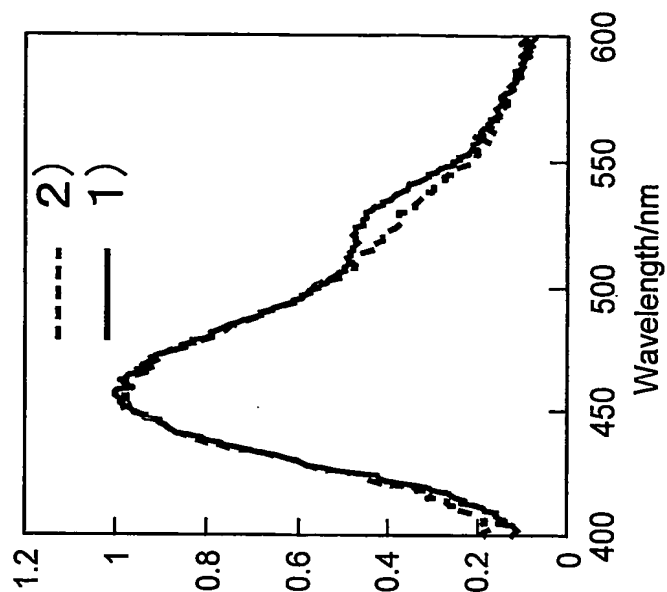


6 / 11

Fig. 5





7/11  
Fig. 6

8 / 11  
Fig. 7

[GENETYX-MAC: Hydrophilicity / Hydrophobicity Plot]

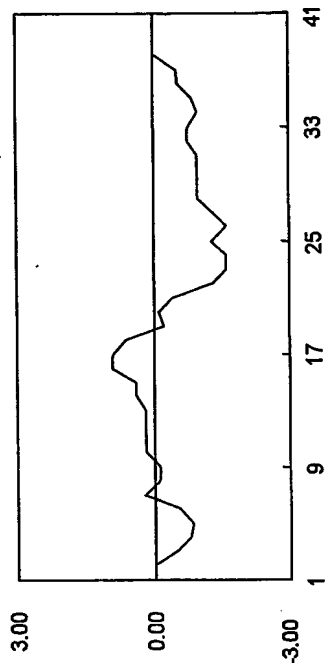
Filename : bNST-Noc/OFQ(ComplimentaryAA)

Sequence Size : 40

Sequence Position: 1 - 40

Parameter : Hopp & Woods

Range to Average : 6



[GENETYX-MAC: Hydrophilicity / Hydrophobicity Plot]

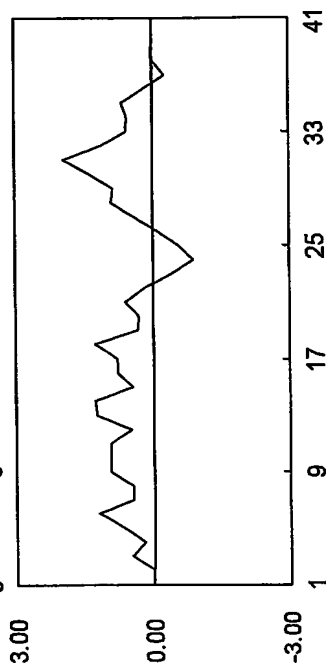
Filename : bNST-Noc/OFQ-AA

Sequence Size : 40

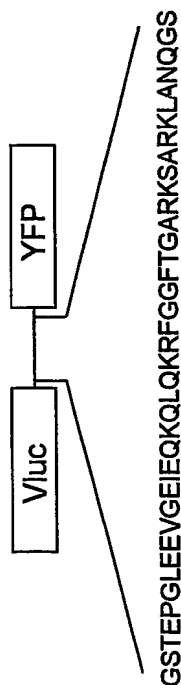
Sequence Position: 1 - 40

Parameter : Hopp & Woods

Range to Average : 6



VL-NST/Noc-YFP

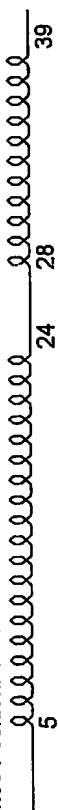


[GENETYX-MAC: CHOU-FASMAN / Schematic Diagram]

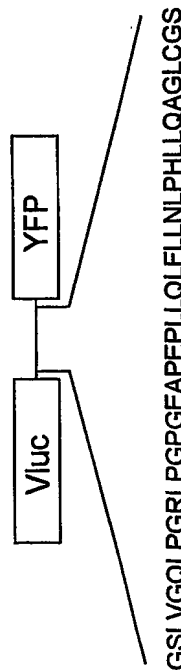
Filename : bNST-Noc/OFQ-AA

Sequence Size : 40

Sequence Position: 1 - 40



VL-NST/Noc(complementary)-YFP



[GENETYX-MAC: CHOU-FASMAN / Schematic Diagram]

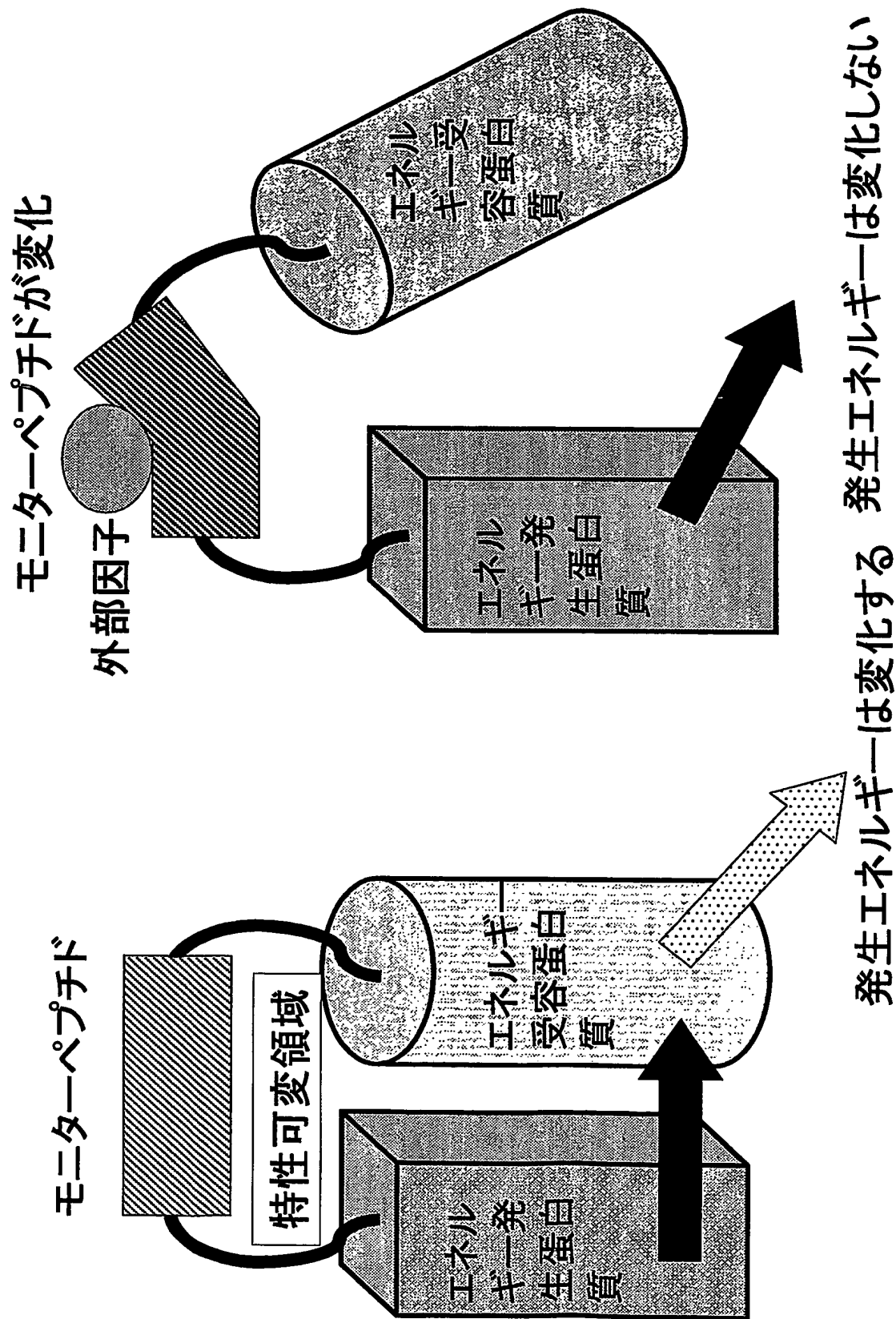
Filename : bNST-Noc/OFQ(ComplimentaryAA)

Sequence Size : 40

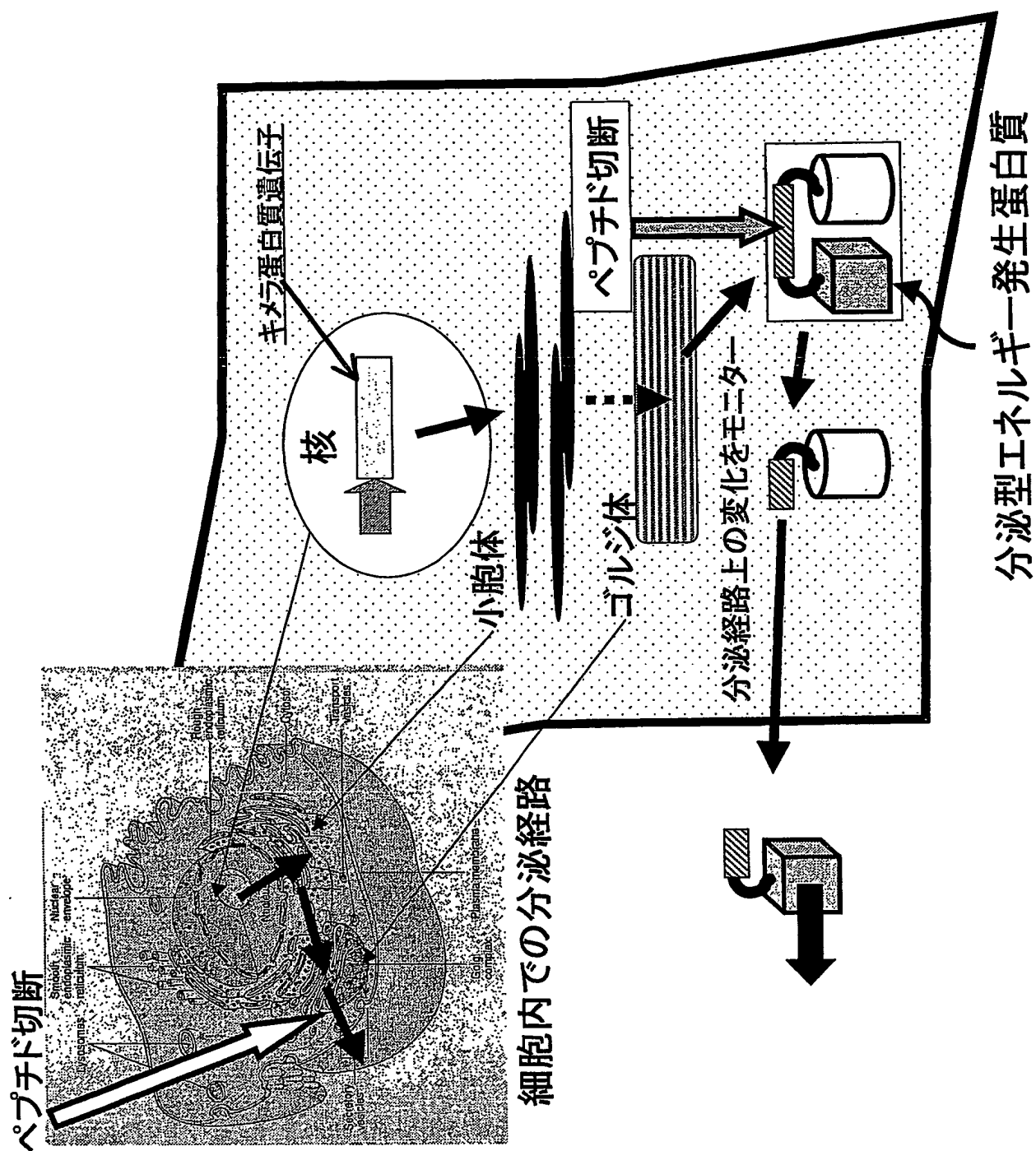
Sequence Position: 1 - 40



9 / 11  
Fig. 8



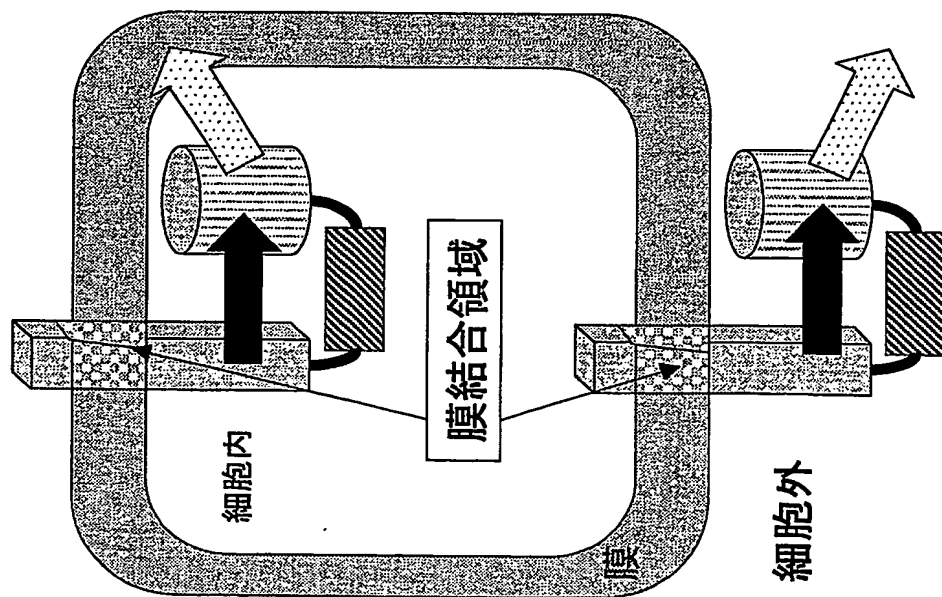
10/11  
Fig. 9



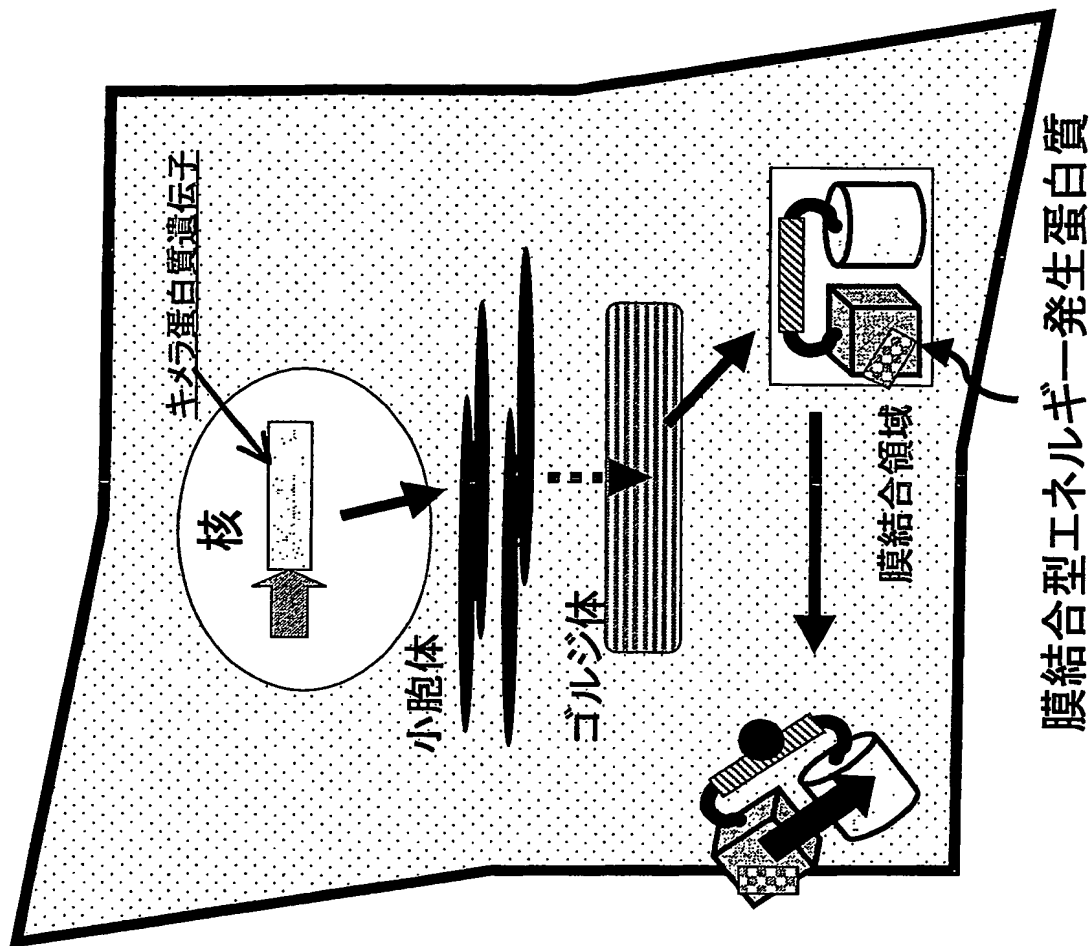
11 / 11  
Fig. 10

膜周辺の

細胞内の変化をモニター



細胞外の変化をモニター



膜結合型エネルギー発生蛋白質

1/20

## SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND  
TECHNOLOGY

<120> Secreted or membrane-bound type chimera protein

<130> P03-74

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<221> CDS

<222> (1)..(2388)

<400> 1

atg aag ata ata att ctg tct gtt ata ttg gcc tac tgt gtc acc gac 48  
Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp  
1 5 10 15

aac tgt caa gat gca tgt cct gta gaa gcg gaa ccg cca tca agt aca 96  
Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr  
20 25 30

cca aca gtt cca act tct tgt gaa gct aaa gaa gga gaa tgt ata gat 144  
Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp  
35 40 45

acc aga tgc gca aca tgt aaa cga gat ata cta tca gat gga ctg tgt 192  
Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys  
50 55 60

gaa aat aaa cca ggg aag aca tgc tgt aga atg tgc cag tat gtg att 240  
Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile

2/20

65	70	75	80	
gaa tgc aga gta gaa gca gct ggt tat ttt aga acg ttt tac ggc aaa				288
Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys				
	85	90	95	
aga ttt aat ttt cag gaa cct ggt aaa tat gtg ctg gct agg gga acc				336
Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr				
	100	105	110	
aag ggt ggc gat tgg tct gta acc ctc acc atg gag aat cta gat gga				384
Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly				
	115	120	125	
cag aag gga gct gtg ctg act aag aca aca ctg gag gtt gca gga gac				432
Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp				
	130	135	140	
gta ata gac att act caa gct act gca gat cct atc aca gtt aac gga				480
Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly				
	145	150	155	160
gga gct gac cca gtt atc gct aac ccg ttc aca att ggt gag gtg acc				528
Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr				
	165	170	175	
att gct gtt gtt gaa ata ccg ggc ttc aat atc aca gtc atc gaa ttc				576
Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe				
	180	185	190	
ttt aaa cta atc gtg att gat att ctg gga gga aga tct gtg aga att				624
Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile				
	195	200	205	
gct cca gac aca gca aac aaa gga ctg ata tct ggt atc tgt ggt aat				672
Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn				

3/20

210	215	220	
ctg gag atg aat gac gct gat gac ttt act aca gat gca gat cag ctg			720
Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu			
225	230	235	240
gcg atc caa ccc aac ata aac aaa gag ttc gac ggc tgc cca ttc tat			768
Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr			
245	250	255	
ggc aat cct tct gat atc gaa tac tgc aaa ggt ctg atg gag cca tac			816
Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr			
260	265	270	
aga gct gta tgt cgt aac aat atc aac ttc tac tat tac act cta tcc			864
Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser			
275	280	285	
tgt gcc ttc gct tac tgt atg gga gga gaa gaa aga gct aaa cac gtc			912
Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val			
290	295	300	
ctt ttc gac tat gtt gag aca tgc gct gcg ccg gaa acg aga gga acg			960
Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr			
305	310	315	320
tgt gtt tta tca gga cat act ttc tat gac aca ttc gac aaa gca aga			1008
Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg			
325	330	335	
tat caa ttc cag ggc cca tgc aag gag att ctg atg gcc gca gac tgt			1056
Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys			
340	345	350	
tac tgg aac aca tgg gat gta aag gtt tca cat aga gac gtc gaa tca			1104
Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser			



355	360	365	
tac act gag gta gag aaa gta aca atc agg aaa cag tca act gta gta			1152
Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val			
370	375	380	
gat ctc att gtg gat ggc aag cag gtc aag gtt gga gga gtg gat gta			1200
Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val			
385	390	395	400
tct atc ccg tac agc tct gag aac act tcc ata tac tgg cag gat gga			1248
Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly			
405	410	415	
gac atc ctg acg acg gcc atc cta cct gaa gct ctt gtc gtt aag ttc			1296
Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe			
420	425	430	
aac ttt aag cag ctc ctt gta gtt cat atc aga gat cca ttc gat gga			1344
Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly			
435	440	445	
aag aca tgc ggc ata tgt ggt aac tat aat caa gat tca act gat gat			1392
Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp			
450	455	460	
ttc ttt gac gca gaa gga gca tgc gct cta acc ccc aac ccc cca gga			1440
Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly			
465	470	475	480
tgt aca gag gaa cag aaa cca gaa gct gag cga ctt tgc aat aat ctc			1488
Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu			
485	490	495	
ttt gat tct tct atc gac gag aaa tgt aat gtc tgc tac aag cct gac			1536
Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp			

5/20

500	505	510	
cgg att gcc cga tgt atg tac gag tat tgc ctg agg gga caa caa gga			1584
Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly			
515	520	525	
ttt tgt gac cat gct tgg gag ttc aag aaa gaa tgc tac ata aaa cat			1632
Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His			
530	535	540	
gga gac act cta gaa gta cca cct gaa tgt caa gga tcc gtg agc aag			1680
Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln Gly Ser Val Ser Lys			
545	550	555	560
ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac			1728
Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp			
565	570	575	
ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc			1776
Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly			
580	585	590	
gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc			1824
Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly			
595	600	605	
aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc ggc tac ggc			1872
Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly			
610	615	620	
ctg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc			1920
Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe			
625	630	635	640
ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc			1968
Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe			

6/20

645	650	655	
ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag			2016
Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu			
660	665	670	
ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag			2064
Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys			
675	680	685	
gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc			2112
Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser			
690	695	700	
cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg			2160
His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val			
705	710	715	720
aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc			2208
Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala			
725	730	735	
gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg			2256
Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu			
740	745	750	
ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc			2304
Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro			
755	760	765	
aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc			2352
Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala			
770	775	780	
ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa			2388
Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			

7/20

785

790

795

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2505

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; chimeric protein

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2505)

&lt;400&gt; 2

atg aag ata ata att ctg tct gtt ata ttg gcc tac tgt gtc acc gac 48  
Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp  
1 5 10 15

aac tgt caa gat gca tgt cct gta gaa gcg gaa ccg cca tca agt aca 96  
Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr  
20 25 30

cca aca gtt cca act tct tgt gaa gct aaa gaa gga gaa tgt ata gat 144  
Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp  
35 40 45

acc aga tgc gca aca tgt aaa cga gat ata cta tca gat gga ctg tgt 192  
Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys  
50 55 60

gaa aat aaa cca ggg aag aca tgc tgt aga atg tgc cag tat gtg att 240  
Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile  
65 70 75 80

gaa tgc aga gta gaa gca gct ggt tat ttt aga acg ttt tac ggc aaa 288  
Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys  
85 90 95

aga ttt aat ttt cag gaa cct ggt aaa tat gtg ctg gct agg gga acc 336  
Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr

8/20

100	105	110	
aag ggt ggc gat tgg tct gta acc ctc acc atg gag aat cta gat gga			384
Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly			
115	120	125	
cag aag gga gct gtg ctg act aag aca aca ctg gag gtt gca gga gac			432
Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp			
130	135	140	
gta ata gac att act caa gct act gca gat cct atc aca gtt aac gga			480
Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly			
145	150	155	160
gga gct gac cca gtt atc gct aac ccg ttc aca att ggt gag gtg acc			528
Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr			
165	170	175	
att gct gtt gtt gaa ata ccg ggc ttc aat atc aca gtc atc gaa ttc			576
Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe			
180	185	190	
ttt aaa cta atc gtg att gat att ctg gga gga aga tct gtg aga att			624
Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile			
195	200	205	
gct cca gac aca gca aac aaa gga ctg ata tct ggt atc tgt ggt aat			672
Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn			
210	215	220	
ctg gag atg aat gac gct gat gac ttt act aca gat gca gat cag ctg			720
Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu			
225	230	235	240
gcg atc caa ccc aac ata aac aaa gag ttc gac ggc tgc cca ttc tat			768
Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr			

9/20

245	250	255	
ggc aat cct tct gat atc gaa tac tgc aaa ggt ctg atg gag cca tac			816
Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr			
260	265	270	
aga gct gta tgt cgt aac aat atc aac ttc tac tat tac act cta tcc			864
Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser			
275	280	285	
tgt gcc ttc gct tac tgt atg gga gga gaa gaa aga gct aaa cac gtc			912
Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val			
290	295	300	
ctt ttc gac tat gtt gag aca tgc gct gcg ccg gaa acg aga gga acg			960
Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr			
305	310	315	320
tgt gtt tta tca gga cat act ttc tat gac aca ttc gac aaa gca aga			1008
Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg			
325	330	335	
tat caa ttc cag ggc cca tgc aag gag att ctg atg gcc gca gac tgt			1056
Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys			
340	345	350	
tac tgg aac aca tgg gat gta aag gtt tca cat aga gac gtc gaa tca			1104
Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser			
355	360	365	
tac act gag gta gag aaa gta aca atc agg aaa cag tca act gta gta			1152
Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val			
370	375	380	
gat ctc att gtg gat ggc aag cag gtc aag gtt gga gga gtg gat gta			1200
Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val			

10/20

385	390	395	400	
tct atc ccg tac agc tct gag aac act tcc ata tac tgg cag gat gga				1248
Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly				
	405	410	415	
gac atc ctg acg acg gcc atc cta cct gaa gct ctt gtc gtt aag ttc				1296
Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe				
	420	425	430	
aac ttt aag cag ctc ctt gta gtt cat atc aga gat cca ttc gat gga				1344
Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly				
	435	440	445	
aag aca tgc ggc ata tgt ggt aac tat aat caa gat tca act gat gat				1392
Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp				
	450	455	460	
ttc ttt gac gca gaa gga gca tgc gct cta acc ccc aac ccc cca gga				1440
Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly				
	465	470	475	480
tgt aca gag gaa cag aaa cca gaa gct gag cga ctt tgc aat aat ctc				1488
Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu				
	485	490	495	
ttt gat tct tct atc gac gag aaa tgt aat gtc tgc tac aag cct gac				1536
Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp				
	500	505	510	
cgg att gcc cga tgt atg tac gag tat tgc ctg agg gga caa caa gga				1584
Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly				
	515	520	525	
ttt tgt gac cat gct tgg gag ttc aag aaa gaa tgc tac ata aaa cat				1632
Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His				

11/20

530	535	540	
gga gac act cta gaa gta cca cct gaa tgt caa gga tcc aca gag ccc 1680			
Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln Gly Ser Thr Glu Pro			
545	550	555	560
ggc ctg gag gag gtg ggg gag att gag cag aaa cag ctg cag aag cgg 1728			
Gly Leu Glu Glu Val Gly Glu Ile Glu Gln Lys Gln Leu Gln Lys Arg			
565	570	575	
ttc ggg ggc ttc acc ggg gcc cgg aag tcg gcc cgg aag ttg gcc aac 1776			
Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Leu Ala Asn			
580	585	590	
cag gga tcc gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc 1824			
Gln Gly Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro			
595	600	605	
atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg 1872			
Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val			
610	615	620	
tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag 1920			
Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys			
625	630	635	
ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg 1968			
Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val			
640	645	650	655
acc acc ttc ggc tac ggc ctg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac 2016			
Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His			
660	665	670	
atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc 2064			
Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val			



12/20

675

680

685

cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc 2112

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg

690

695

700

gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg 2160

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu

705

710

715

aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg 2208

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu

720

725

730

735

gag tac aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag 2256

Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln

740

745

750

aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac 2304

Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp

755

760

765

ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc 2352

Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly

770

775

780

gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc 2400

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser

785

790

795

gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg 2448

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu

800

805

810

815

gag ttc gtg acc gcc gcc ggc atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac 2496

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr

13/20

820

825

830

aag taa 2505

Lys

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2505

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2505)

&lt;400&gt; 3

atg aag ata ata att ctg tct gtt ata ttg gcc tac tgt gtc acc gac 48

Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp

1

5

10

15

aac tgt caa gat gca tgt cct gta gaa gcg gaa ccg cca tca agt aca 96

Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr

20

25

30

cca aca gtt cca act tct tgt gaa gct aaa gaa gga gaa tgt ata gat 144

Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp

35

40

45

acc aga tgc gca aca tgt aaa cga gat ata cta tca gat gga ctg tgt 192

Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys

50

55

60

gaa aat aaa cca ggg aag aca tgc tgt aga atg tgc cag tat gtg att 240

Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile

65

70

75

80

gaa tgc aga gta gaa gca gct ggt tat ttt aga acg ttt tac ggc aaa 288

Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys

85

90

95

14/20

aga ttt aat ttt cag gaa cct ggt aaa tat gtg ctg gct agg gga acc 336  
Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr  
100 105 110

aag ggt ggc gat tgg tct gta acc ctc acc atg gag aat cta gat gga 384  
Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly  
115 120 125

cag aag gga gct gtg ctg act aag aca aca ctg gag gtt gca gga gac 432  
Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp  
130 135 140

gta ata gac att act caa gct act gca gat cct atc aca gtt aac gga 480  
Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly  
145 150 155 160

gga gct gac cca gtt atc gct aac ccg ttc aca att ggt gag gtg acc 528  
Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr  
165 170 175

att gct gtt gtt gaa ata ccg ggc ttc aat atc aca gtc atc gaa ttc 576  
Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe  
180 185 190

ttt aaa cta atc gtg att gat att ctg gga gga aga tct gtg aga att 624  
Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile  
195 200 205

gct cca gac aca gca aac aaa gga ctg ata tct ggt atc tgt ggt aat 672  
Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn  
210 215 220

ctg gag atg aat gac gct gat gac ttt act aca gat gca gat cag ctg 720  
Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu  
225 230 235 240

15/20

gcg atc caa ccc aac ata aac aaa gag ttc gac ggc tgc cca ttc tat 768  
Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr  
245 250 255

ggc aat cct tct gat atc gaa tac tgc aaa ggt ctg atg gag cca tac 816  
Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr  
260 265 270

aga gct gta tgt cgt aac aat atc aac ttc tac tat tac act cta tcc 864  
Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser  
275 280 285

tgt gcc ttc gct tac tgt atg gga gga gaa gaa aga gct aaa cac gtc 912  
Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val  
290 295 300

ctt ttc gac tat gtt gag aca tgc gct gcg ccg gaa acg aga gga acg 960  
Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr  
305 310 315 320

tgt gtt tta tca gga cat act ttc tat gac aca ttc gac aaa gca aga 1008  
Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg  
325 330 335

tat caa ttc cag ggc cca tgc aag gag att ctg atg gcc gca gac tgt 1056  
Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys  
340 345 350

tac tgg aac aca tgg gat gta aag gtt tca cat aga gac gtc gaa tca 1104  
Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser  
355 360 365

tac act gag gta gag aaa gta aca atc agg aaa cag tca act gta gta 1152  
Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val  
370 375 380

16/20

gat ctc att gtg gat ggc aag cag gtc aag gtt gga gga gtg gat gta 1200  
Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val  
385 390 395 400

tct atc ccg tac agc tct gag aac act tcc ata tac tgg cag gat gga 1248  
Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly  
405 410 415

gac atc ctg acg acg gcc atc cta cct gaa gct ctt gtc gtt aag ttc 1296  
Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe  
420 425 430

aac ttt aag cag ctc ctt gta gtt cat atc aga gat cca ttc gat gga 1344  
Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly  
435 440 445

aag aca tgc ggc ata tgt ggt aac tat aat caa gat tca act gat gat 1392  
Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp  
450 455 460

ttc ttt gac gca gaa gga gca tgc gct cta acc ccc aac ccc cca gga 1440  
Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly  
465 470 475 480

tgt aca gag gaa cag aaa cca gaa gct gag cga ctt tgc aat aat ctc 1488  
Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu  
485 490 495

ttt gat tct tct atc gac gag aaa tgt aat gtc tgc tac aag cct gac 1536  
Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp  
500 505 510

cgg att gcc cga tgt atg tac gag tat tgc ctg agg gga caa caa gga 1584  
Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly  
515 520 525

17/20

ttt tgt gac cat gct tgg gag ttc aag aaa gaa tgc tac ata aaa cat 1632  
Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His  
530 535 540

gga gac act cta gaa gta cca cct gaa tgt caa gga tcc ctg gtt ggc 1680  
Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln Gly Ser Leu Val Gly  
545 550 555 560

caa ctt ccg ggc cga ctt ccg ggc ccc ggt gaa gcc ccc gaa ccg ctt 1728  
Gln Leu Pro Gly Arg Leu Pro Gly Pro Gly Glu Ala Pro Glu Pro Leu  
565 570 575

ctg cag ctg ttt ctg ctc aat ctc ccc cac ctc ctc cag gcc ggg ctc 1776  
Leu Gln Leu Phe Leu Leu Asn Leu Pro His Leu Leu Gln Ala Gly Leu  
580 585 590

tgt gga tcc gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc 1824  
Cys Gly Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro  
595 600 605

atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg 1872  
Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val  
610 615 620

tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag 1920  
Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys  
625 630 635

ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg 1968  
Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val  
640 645 650 655

acc acc ttc ggc tac ggc ctg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac 2016  
Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His  
660 665 670

18/20

atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc 2064  
Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val  
675 680 685

cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc 2112  
Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg  
690 695 700

gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg 2160  
Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu  
705 710 715

aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg 2208  
Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu  
720 725 730 735

gag tac aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag 2256  
Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln  
740 745 750

aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac 2304  
Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp  
755 760 765

ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc 2352  
Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly  
770 775 780

gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc 2400  
Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser  
785 790 795

gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg 2448  
Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu  
800 805 810 815

19/20

gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac 2496  
Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr  
820 825 830

aag taa 2505  
Lys

<210> 4  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Insertion peptide

<400> 4  
Gly Ser Thr Glu Pro Gly Leu Glu Glu Val Gly Glu Ile Glu Gln Lys  
1 5 10 15

Gln Leu Gln Lys Arg Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala  
20 25 30

Arg Lys Leu Ala Asn Gln Gly Ser  
35 40

<210> 5  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Insertion peptide

<400> 5  
Gly Ser Leu Val Gly Gln Leu Pro Gly Arg Leu Pro Gly Pro Gly Glu  
1 5 10 15

Ala Pro Glu Pro Leu Leu Gln Leu Phe Leu Leu Asn Leu Pro His Leu  
20 25 30

Leu Gln Ala Gly Leu Cys Gly Ser



20/20

35

40

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; primer 1

&lt;400&gt; 6

cacaagcttc cattgtgctg gatgaagata ataattctgt ctgttatatt ggc

53

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; primer 2

&lt;400&gt; 7

tgtggatcct tgacattcag gtggtacttc tag

33

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; primer 3

&lt;400&gt; 8

caagcttgcg gccgcaggat ccgtgagcaa gggcgaggag ctgttcac

48

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; primer 4

&lt;400&gt; 9

taccattgtg ctggatggcg agcaagggcg aggagctg

38

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mammalian

&lt;400&gt; 10

Ser Glu Gln Lys Gln Leu Gln Lys Arg Phe Gly Gly Phe Thr Gly Gly

1

5

10

15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/11285

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C07K19/00, C07K14/00, C12N15/09, C12Q1/66		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C07K19/00, C07K14/00, C12N15/09, C12Q1/66		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA (STN), JSTPlus (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Day R.N., Kawechi M., Berry D., Dual-function reporter protein for analysis of gene expression in living cells., Biotechniques(1998), Vol.25, No.5, p.848-50, 852-4, 856	1-16
Y	WO 01/46694 A (BIOSIGNAL PACKARD INC.), 28 June, 2001 (28.06.01), (Family: none)	1-16
Y	Thompson E.M. et al., Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod Vargula hilgendorffii., Proc.Natl.Acad.Sci.USA. (1989), Vol.86, No.17, pages 6567 to 6571	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
*	Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"&"	document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
15 October, 2003 (15.10.03)	28 October, 2003 (28.10.03)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/11285

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Yu Y.A., Szalay A.A., A Renilla luciferase-Aequorea GFP (ruc-gfp) fusion gene construct permits real-time detection of promoter activation by exogenously administered mifepristone in vivo., Mol.Genet.Genomics., 2002 Oct; 268(2): 169-78., Epub. 17 September, 2002 (17.09.02)	1-16
A	Baker A., Cotten M., Delivery of bacterial artificial chromosomes into mammalian cells with psoralen-inactivated adenovirus carrier., Nucleic.Acids.Res.(1997), Vol.25, No.10, pages 1950 to 1956	1-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11285

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 16 resides in a chimeric protein composed of an energy-generating protein and an energy-receiving protein ligated to each other.

As the results of the search, however, it is found out that such a chimeric protein composed of an energy-generating protein and an energy-receiving protein ligated to each other is not novel because of having been already disclosed in documents (Day RN et.al., Biotechniques (1998), Vol.25, No.5, p.848-50, 852-4, 856; WO 01/46694 A (BIOSIGNAL PACKARD INC.) 28, June, 2001 (28.06.01)).

(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Therefore, this common matter falls within the category of the prior art and cannot be regarded as a special technical matter in the meaning within PCT Rule 13.2.

Such being the case, there is no special technical matter common to all claims and the above groups of inventions are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

<Subject of search>

The inventions as claimed in claims 1 to 16 involve an extremely large number of compounds. However, only part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Such being the case, the search was made exclusively on the parts supported by the description and disclosed therein, namely, the inventions relating to the chimeric protein composed of *Cypridina* luciferase and EYFP as claimed in claims 1 to 16.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K19/00, C07K14/00, C12N15/09, C12Q1/66

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K19/00, C07K14/00, C12N15/09, C12Q1/66

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA (STN), JSTPlus (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Day RN, Kaweck M, Berry D., Dual-function reporter protein for analysis of gene expression in living cells., Biotechniques (1998), Vol. 25, No. 5, p. 848-50, 852-4, 856	1-16
Y	WO 01/46694 A (BIOSIGNAL PACKARD INC.) 2001.06.28 (ファミリーなし)	1-16
Y	Thompson EM, et.al., Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod Vargula hilgendorfii., Proc Natl Acad Sci U S A. (1989), Vol. 86, No. 17, p. 6567-6571	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 10. 03

国際調査報告の発送日

28.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子



4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Yu YA, Szalay AA., A Renilla luciferase-Aequorea GFP (ruc-gfp) fusion gene construct permits real-time detection of promoter activation by exogenously administered mifepristone in vivo., Mol Genet Genomics. (2002 Oct;268(2):169-78. Epub 2002 Sep 17.	1 - 1 6
A	Baker A, Cotten M., Delivery of bacterial artificial chromosomes into mammalian cells with psoralen-inactivated adenovirus carrier., Nucleic Acids Res. (1997), Vol. 25, No. 10, p. 1950-1956	1 - 1 6

<調査の対象について>

請求の範囲 1-16に係る発明には、非常に多数の化合物が含有される。しかしながら、PCT 6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎない。

よって、調査は、明細書に裏付けられ、開示されている部分、すなわち、請求の範囲 1-16 のウミホタルルシフェラーゼと EYFP からなるキメラ蛋白質に関する発明のみのについて行った。



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (P C T 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって P C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-16に共通の事項は、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質を連結してなるキメラ蛋白質である。

しかしながら、調査の結果、エネルギー発生蛋白質とエネルギー受容蛋白質を連結してなるキメラ蛋白質は文献Day RN, et. al., Biotechniques (1998), Vol. 25, No. 5, p. 848-50, 852-4, 856, WO 01/46694 A (BIOSIGNAL PACKARD INC.) 2001. 06. 28に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。

よって、この共通事項は先行技術の域を出るものではないから、P C T 規則13.2における特別な技術事項であるとはいえない。

それ故に請求の範囲の全てに共通の特別な技術事項はなく、上記発明群が単一の一般的な発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☒ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**